

## 백서 피질 신경원 혼합배양 모델에서 $\alpha$ -amino-5-methyl-4-isoxazolepropionate로 유도된 뇌독성에 대한 Propofol의 효과

아주대학교 의과대학 마취통증의학교실

서명신 · 박성용 · 김계숙 · 문봉기 · 김진수 · 이숙영

### The effects of propofol on neurotoxicity induced by $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid in rat mixed cortical cultures

Myoung-Sin Seo, M.D., Sung Yong Park, M.D., Kye-Sook Kim, M.D., Bong-Ki Moon, M.D., Jin-Soo Kim, M.D., and Sook Young Lee, M.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Background:** The pattern of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-mediated neurotoxicity (necrosis vs apoptosis) and the neuroprotective effect of propofol on AMPA-mediated neurotoxicity are still unclear.

**Methods:** Thirteen-day-old primary rat mixed cortical cultures were used. To measure the neuroprotective effect of propofol, AMPA (50  $\mu$ M), AMPA (50  $\mu$ M) plus propofol (0.1, 1, 25, 50  $\mu$ M), AMPA (50  $\mu$ M) plus DMSO, propofol (50  $\mu$ M) and DMSO were administered (n = 45). Seventy-two h later, surviving cells were counted using trypan blue staining and were converted to cell death rate (CDR). To measure the effect of propofol (50  $\mu$ M) on AMPA (50  $\mu$ M)-induced apoptosis, a triple stain was done. In a fixed field ( $\times 400$ ), the number of neuronal cells stained by neuronal nuclei (NeuN) and Hoechst staining and apoptotic cells stained by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) assays were counted. Apoptotic cell rates (ACR) were also calculated. Statistical analyses were performed using one way-analysis of variance followed by Bonferroni's test. P < 0.05 was considered statistically significant.

**Results:** AMPA (50  $\mu$ M) stimulation demonstrated 49.3% CDR, and adding propofol 50  $\mu$ M decreased CDR to 29.4% (P < 0.05). In the TUNEL assay, cells with no drug treatment demonstrated 12.3% ACR and 50  $\mu$ M AMPA increased ACR to 28% (P < 0.05). Adding 50  $\mu$ M propofol to AMPA decreased the ACR to 20.1% (P < 0.05).

**Conclusions:** Propofol (50  $\mu$ M) had neuroprotective effects against AMPA (50  $\mu$ M)-induced cell death by reducing apoptosis. (Korean J Anesthesiol 2008; 55: 607~12)

**Key Words:**  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, apoptosis, propofol.

## 서 론

뇌허혈시 세포외 흥분성 아미노산(glutamate, aspartate 등)이 급격히 증가하며,<sup>1,2)</sup> 이에 의한 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 혹은  $\alpha$ -amino-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), kainate 수용체와 같은 glutamate 수용체의 과도한 흥분과 신경흥분

독성 연속단계(excitotoxic cascade)의 활성화가 세포 손상 기전 중 하나이다.<sup>1-7)</sup>

2, 6-diisopropylphenol (propofol)은 주로 gamma-aminobutyric acid A 수용체에 작용하여 마취효과를 나타내는 정맥마취제이며, 매우 빠른 각성 등의 장점으로 인해 외래 통원수술에 많이 사용되고 있고, 여러가지 기전에 의해 뇌보호 작용이 있다고 알려지면서,<sup>8-14)</sup> 신경외과 마취영역 등에서 사용이 증가되고 있다.

AMPA 수용체의 과도한 자극은 괴사(necrosis) 혹은 세포자멸사(apoptosis) 형태의 신경세포 손상을 일으킨다 보고되고 있으나 확실히 밝혀진 것은 아니며,<sup>15-17)</sup> AMPA 수용체에 대한 propofol의 작용과 AMPA 자극에 대한 propofol의 뇌보호 작용에 관한 보고는 거의 없으며, 보고 내용도 일정치 않다.<sup>12,18,19)</sup>

논문접수일 : 2008년 5월 29일

책임저자 : 이숙영, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5

아주대학교 의과대학 마취통증의학교실, 우편번호: 442-721

Tel: 031-219-4658, Fax: 031-219-5579

E-mail: anesylee@ajou.ac.kr

아주대학교 의료원 대학원 연구과제 3-2005-026-0임

저자들은 백서 피질 신경원 배양 모델에서 72시간 동안 AMPA (50  $\mu$ M) 자극과 동시에 0.1–50  $\mu$ M 농도의 propofol 을 투여하여 propofol이 뇌보호 효과가 있는지, AMPA가 세포자멸사 형태의 신경세포 손상을 얼마나 일으키며, AMPA 로 유도된 세포자멸사에 대하여 propofol이 감소 효과가 있는지 알아보고자 하였다.

### 대상 및 방법

이 실험은 본 병원 실험실 동물 관리 및 윤리 규정에 따라 행하였다. 몸무게 250–300 g의 임신한지 16일 되는 백서(Sprague-Dawley)를 물과 먹이가 충분히 공급되는 사육실에서 주위 환경에 적응시키며 하루동안 사육한 후 임신 17 일째 제왕절개를 통해 태아를 꺼내어 세포배양 실험을 진행하였다. 실험에 필요한 시료들 중 Eagle's minimum essential medium (MEM), glucose, 5% horse serum (HS), 5% fetal bovine serum (FBS), trypan-blue stain은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)로부터, AMPA, glutamine, poly-D-lysine, cytosine  $\beta$ -D-arabino-furanoside hydrochloride (Ara C), 4% paraformaldehyde, propofol은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 로 부터, laminin은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터, 1% Triton은 USB (Cleveland, OH, USA)로부터 구입하였다. Propofol은 지용성 이어서 물에 잘 녹지 않으므로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 각 농도에 사용할 propofol 농축액을 만들어 놓은 후 실험시 해당 배지에 희석하여 사용하였다. 이때 DMSO의 배양액내 최종 용적은 1.5  $\mu$ l였다.

### 세포배양

실험전 20 mM 포도당, 5% HS, 5% FBS, 2 mM glutamine 을 섞은 MEM과 혼합하여 만든 100  $\mu$ g/ml poly-D-lysine과 4  $\mu$ g/ml laminin으로 24-well 배양 플레이트를 코팅 처리하였다. 이때 일부는 immuno-staining을 위해서 24 well 배양접시에 아크라를 놓고 코팅처리 하였다. 백서를 ether 마취상자에 넣어 마취제를 흡입시켰으며, 호흡이 없어진 것을 확인한 후 꺼내어 경추탈골을 시켰다. 태아를 제왕절개를 통해 꺼낸 후, 20 mM 포도당을 섞은 MEM 용액에 담그고 태아의 뇌피질 부분을 분리하였다. 분리된 뇌 피질을 pasteur pipette으로 가볍게 분쇄한 뒤 미리 코팅된 24-well 배양 플레이트에 400  $\mu$ l, 35 mm 배양 접시에 2 ml 씩 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 유산소배양기(aerobic chamber)에서 배양하였다. 배양한 세포는 1주후 glia가 자라나면 20 mM 포도당, 5% HS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM 용액과 혼합하여 만든 10  $\mu$ M Ara C로 처리하였고, Ara C 처리 후부터 실험 전까지 이를 간격으로 Ara C를 뺀 같은 배양액으로 1/3 씩 바꾸어 주었다.

### 살아있는 세포수 측정

**약물처리:** 세포배양 시작후 13일째 되는 날 실시하였으며, 약물 처리하지 않은 대조군(대조군), 100  $\mu$ M NMDA 투여 대조군(full kill 군), 50  $\mu$ M AMPA 투여군, 50  $\mu$ M AMPA + propofol 0.1, 1, 10, 25, 50  $\mu$ M 혼합 투여군, 50  $\mu$ M AMPA + DMSO 1.5  $\mu$ l 혼합 투여군, propofol 50  $\mu$ M 투여군, DMSO 1.5  $\mu$ l 투여군 등으로 나누었다. 각 군의 약물은 20 mM 포도당, 5% HS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM에 섞었으며, 유산소배양기에서 72시간동안 배양하였다.

**살아있는 세포수 측정:** 약물처리 72시간 후 살아있는 세포수를 측정하였다. 10% trypan-blue stain을 15  $\mu$ l/well씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 15분간 배양하여 염색하였다. 이후 eyepiece micrometer square 10  $\times$  10 grid (Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 염색되지 않은 살아있는 세포 수를 세었다. 모든 군은 5마리의 쥐에서 결과를 얻었으며, 각 군당 15 well의 실험을 하였고, well 당 세 구역씩 선정하여 well의 중심 부위로부터 겹치지않게 살아있는 세포수를 세었다 (n = 45).

세포수를 수식 [100  $\times$  (대조군값 - 실험군값/대조군값 - full-kill군값)]을 사용하여 대조군의 값을 0으로, full kill군의 값을 100으로 놓고, 각 실험군의 죽은 세포 백분율을 구하였으며, SPSS 12.0을 이용하여 one-way ANOVA test (one-way analysis of variance)실시하였고 사후 검증은 Bonferroni test 로 실시하였다. 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내고 P < 0.05 시 유의있는 것으로 간주하였다.

**Immunocytochemical staining (Triple stain):** 24-well 배양 플레이트에서 키운 세포중 아크라 위에서 키운 13일째 세포를 사용하였으며, 모든군은 3마리의 쥐에서, 각 실험당 1개의 well을 사용하여 5구역/well을 선정하여 결과를 얻었다(n = 15). 아무 약도 처리하지 않은 대조군, 50  $\mu$ M AMPA 투여군, 50  $\mu$ M AMPA + propofol 50  $\mu$ M 혼합 투여군으로 나누었다. 72시간 후 phosphated-buffered saline (PBS)으로 3회 씻어낸 후 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 동안 세포를 고정시켰다. PBS로 3회 씻은 후 1% Triton  $\times$  100이 포함된 PBS로 4°C에서 2분 동안 두었다.

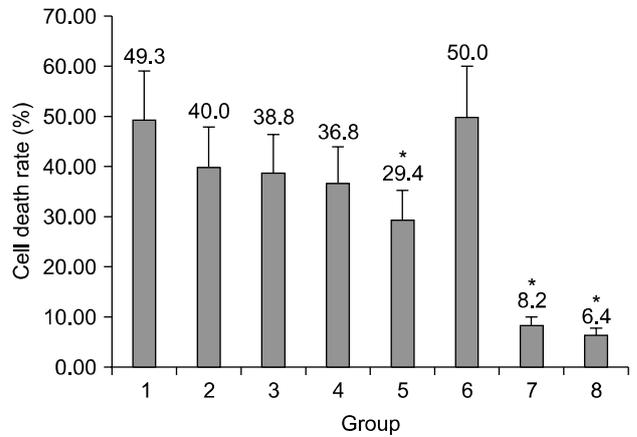
Neuronal nuclei (NeuN) Stain은 neuronal cell의 존재를 알기위한 형광염색이며(초록색) 1차 항체인 mouse anti-neuronalnuclein (NeuN) monoclonal antibody (Jackson Immuno-Reserch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)를 1 : 250비율로 20  $\mu$ l 첨가하여 2시간 동안 incubation시켰다. 이후 PBST로 3회 씻어내었으며, 2차 항체인 Fluorescein (FITC)-conjugated affinipure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoReserch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)를 1 : 200비율로 20  $\mu$ l 첨가후 2시간 동안 반응시켰다.

Hoechst Stain은 DNA나 핵이 있는지 알기위한 형광염색이며(파랑색), PBS로 2회 씻어낸 후 Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 1 : 1000 비율로 5분 동안 염색한 후 PBS로 2회, 증류수로 1회 씻어내었다.

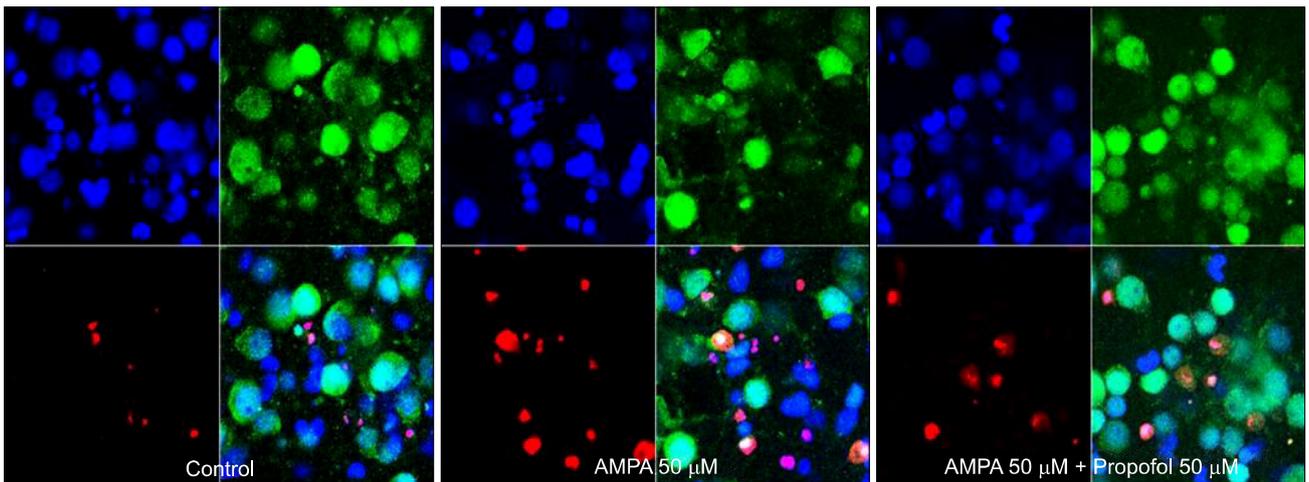
Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) stain은 apoptotic cell을 알아보기 위한 형광염색이며(빨간색), in situ cell death detection kit (TMR red, Roche, Mannheim, Germany)을 사용하였다. Mounting solution을 사용하여 slide glass에 붙인후, confocal 현미경(Carl Zeiss Laser Scanning System LSM 510, Oberkochen, Germany)을 이용하여  $\times 400$ 과  $\times 800$  배율로 관찰하였다. 각군에서  $\times 400$  배율 하에서 5구역을 선택하여, NeuN과 Hoechst stain으로 염색된 전체 신경원의 수를 센 후 TUNEL assay에서 형광 염색된 세포 중 NeuN과 Hoechst stain이 동시에 되었는지 확인하여 세포자멸사가 일어난 세포 수를 세었으며, 전체 신경원수 중 세포자멸사가 일어난 세포의 비율을 구하였다. 통계처리는 앞과 같은 방법으로 시행하였다.

**결 과**

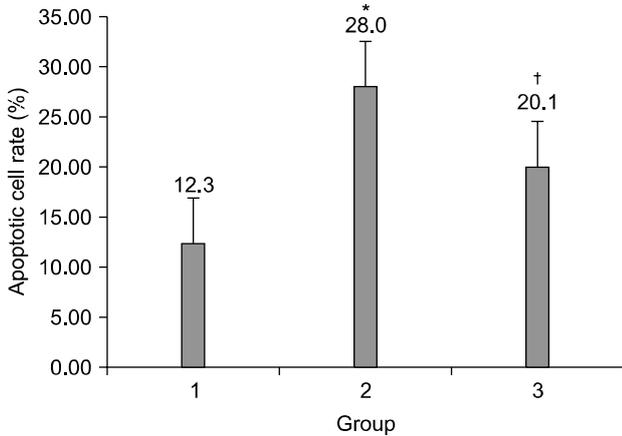
세포사된 신경원의 비율은 50  $\mu$ M AMPA 투여군, 50  $\mu$ M AMPA + propofol 0.1, 1, 10, 25, 50  $\mu$ M 혼합투여군, 50  $\mu$ M AMPA + DMSO 1.5  $\mu$ l 혼합 투여군, propofol 50  $\mu$ M 투여군, DMSO 1.5  $\mu$ l 투여군에서 각각  $49.3 \pm 13.1\%$ ,  $40.0 \pm 12.9\%$ ,  $38.8 \pm 15.0\%$ ,  $36.8 \pm 14.8\%$ ,  $29.4 \pm 17.1\%$ ,  $50.0 \pm$



**Fig. 1.** Effects of propofol on cell death rate (CDR, control group CDR set as 0%, full-kill group CDR set as 100%) 72 hr, 50  $\mu$ M  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) treatment in the rat mixed cortical brain cultures. Adding propofol 50  $\mu$ M to AMPA stimulation decreased CDR. Number of each group are 45. Values are mean  $\pm$  SD. Group 1: AMPA 50  $\mu$ M treated group, Group 2: AMPA (50  $\mu$ M) plus propofol (0.1  $\mu$ M) treated group, Group 3: AMPA (50  $\mu$ M) plus propofol (1  $\mu$ M) treated group, Group 4: AMPA (50  $\mu$ M) plus propofol (25  $\mu$ M) treated group, Group 5: AMPA (50  $\mu$ M) plus propofol (50  $\mu$ M) treated group, Group 6: AMPA (50  $\mu$ M) plus DMSO (1.5  $\mu$ l) treated group, Group 7: Propofol (50  $\mu$ M) treated group, Group 8: DMSO (1.5  $\mu$ l) treated group. Group 7 and 8 demonstrated no significant differences compared to control group. \*: P < 0.05 vs AMPA (50  $\mu$ M) treated group.



**Fig. 2.** Figure shows the results of immunocytochemical staining in the rat mixed cortical brain cultures. Neuronal nuclei (NeuN) Stain (green color) exhibit the presence of neuron cells, Hoechst Stain (blue color) exhibit the presence of nucleus and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) (red color) assay exhibit the presence of apoptotic cells. Control: cells with no drug treatment, AMPA 50  $\mu$ M: 72 hr after  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA 50  $\mu$ M) treated group, AMPA 50  $\mu$ M + propofol 50  $\mu$ M: 72 hr after AMPA (50  $\mu$ M) plus propofol (50  $\mu$ M) treated group.



**Fig. 3.** Effects of propofol (50 μM) on apoptosis 72 hr after 50 μM α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) treatment in the rat mixed cortical brain cultures. Number of neurons/field were counted by Neuronal nuclei and Hoechst stain and apoptotic cells were counted by TUNEL assay. Then, apoptotic cell rate were calculated. Number of each group are 15. Values are mean ± SD. Group 1: control group (no drug treated group), Group 2: AMPA (50 μM) treated group, Group 3: AMPA (50 μM) plus propofol (50 μM) treated group. \*: P < 0.05 vs no drug treated group, †: P < 0.05 vs AMPA (50 μM) treated group.

10.1%, 8.2 ± 12.9%, 6.4 ± 12.4%였다(Fig. 1).

Propofol 50 μM 투여군과 DMSO 1.5 μl 투여군의 세포사율은 대조군에 비해 유의있는 차이가 없었다(Fig. 1, P > 0.05). Propofol 25 μM 이하 혼합투여군에서는 유의있는 세포사율의 감소가 없었으며(P > 0.05), propofol 50 μM 혼합투여군에서는 유의있는 세포사율의 감소를 보였다(n = 45/군)(Fig. 1, P < 0.05). DMSO 1.5 μl 혼합투여군에서는 유의있는 세포사율의 감소가 없었다(Fig. 1, P > 0.05).

세포자멸사를 보는 Triple staining 결과 세포자멸사를 일으킨 신경원의 비율은 대조군, AMPA 50 μM 투여군, AMPA 50 μM + propofol 50 μM 혼합 투여군에서 각각 12.3 ± 2.5%, 28.0 ± 5.6%, 20.1 ± 4.0%였으며, 대조군에 비해 AMPA 50 μM 단독투여군에서 유의있게 증가하였고(P < 0.05), AMPA 50 μM 단독투여군에서 비해 AMPA 50 μM + propofol 50 μM 혼합투여군에서 유의있게 감소하였다.(n = 15/군)(Fig. 2, 3, P < 0.05).

### 고 찰

뇌허혈, 뇌손상 등의 임상상황에서는 흥분성 아미노산들(glutamate, aspartate 등)이 synaptic cleft에 급격히 증가하게 되며, 이들에 의한 excitotoxicity가 뇌손상의 주요 기전 중 하나이다.<sup>1-7)</sup>

증가된 glutamate는 시냅스 후부의 NMDA, AMPA, kainate 등의 ionotropic 수용체를 흥분시키게 되며,<sup>20,21)</sup> 이에 의해 급격히 증가된 세포내 Ca<sup>2+</sup>에 의해 일련의 뇌손상 작용이 일어나게 되는데,<sup>3-7)</sup> Na<sup>+</sup> 과부하에 의한 세포질성 구조물들의 팽창을 주 특징으로 하는 괴사 형태의 세포사멸(cell death)을 주로 일으키지만,<sup>22-24)</sup> DNA 분열과 염색질응축을 특징으로 하는 세포자멸사 형태의 세포사멸도 glutamate수용체에 의한 excitotoxicity에서 나타난다는 보고가 많다.<sup>25,26)</sup>

본 연구에서 사용된 AMPA 자극에 의해 활성화되는 AMPA 수용체는 4개의 단백질인 GluR1-4(A-D)의 조합에 의해 이루어져 있으며,<sup>27)</sup> 이들의 조합이나 RNA editing에 의해 AMPA 수용체의 기능이 달라진다고 하는데,<sup>28,29)</sup> GluR2가 많이 함유되어 있으면 Ca<sup>2+</sup> 투과성이 낮고, GluR2가 적게 함유되어 있으면 Ca<sup>2+</sup> 투과성이 높다고 하며, 대부분의 신경세포는 전자에 속하며, 해마에 분포하는 neuron, neocortex 등이 후자에 속한다.<sup>27-32)</sup> 본 연구에서는 대뇌 피질 신경원을 사용하여 연구하였으며, Ca<sup>2+</sup> 투과성이 높다고 알려진 세포는 아니다.

Glutamate 수용체의 과도한 흥분에 의해 일어나는 excitotoxicity는 대부분 NMDA 수용체의 의해 일어나지만, AMPA 수용체 등의 비 NMDA 수용체도 관여한다.

Frandsen 등은<sup>33)</sup> AMPA 등의 비-NMDA수용체도 excitotoxicity에 관여한다 보고하였다. Garthwaite 등은<sup>15)</sup> AMPA에 의한 세포손상이 세가지 기전으로 일어남을 관찰하였는데, 소뇌의 golgi 세포에서 빠르게 팽창성으로 오는 괴사 형태의 손상은 NMDA 자극시와 마찬가지로 Ca<sup>2+</sup>의 세포 내로의 유입에 의해 일어나며, 나머지 뇌부분에서는 세포자멸사 양상으로 서서히 뇌손상을 나타낸다 하였는데, 이는 본 연구에서와 같은 대뇌피질 신경원을 사용한 연구는 아니었다.

Gwag 등은<sup>24)</sup> 쥐의 피질신경원 배양 모델에서 3-100 μM AMPA 자극을 주며 24시간 관찰한 결과 대부분 괴사 형태의 손상이 나타나나, 세포자멸사 형태의 손상이 혼재되어 있을 가능성을 배제하지 못한다 하였으며, Koh 등은<sup>7)</sup> 쥐의 피질신경원 배양에 모델에서 500 μM AMPA 5분 자극을 주어 세포손상을 주지 못하였지만, 5 μM AMPA 20-24시간 자극은 용량의존적으로 lactic dehydrogenase (LDH, 괴사 형태의 세포손상시 증가) 증가와 세포손상 면적을 증가시켜 강력한 뇌독성을 나타내었다 하였으며, 짧은 고농도의 자극보다 긴 저농도의 자극이 뇌독성을 나타내는 이유는 AMPA 수용체가 NMDA 수용체와 달리 Ca<sup>2+</sup> 투과성이 낮기 때문이라 하였다. 또한, Larm 등은<sup>17)</sup> 백서의 피질 신경원세포 배양모델에서 100-300 μM의 (S)-AMPA를 24시간 투여하여 본 결과 50% 정도의 세포에서 세포자멸사 형태의 세포사를 일으킨다 하였다. 본 연구에서는 Gwag, Koh, Larm 등의<sup>7,17,24)</sup> 연구에서와 같은 백서 피질신경원 모델을 사용하였는데,

30–100  $\mu\text{M}$  AMPA 자극을 8, 24시간 주며 예비실험을 해 본 결과 세포사율이 높지 않아 72시간 동안 50  $\mu\text{M}$  AMPA 자극을 주었으며, 49.3%의 세포사율을 보였으며, 전체 신경 세포중 세포자멸사를 일으킨 비율이 28.01%였다. LDH 측정 등 괴사 형태의 세포손상을 보는 실험을 하지 않았지만, 위의 연구들로 미루어볼 때 괴사와 세포자멸사가 혼재된 형태의 세포사가 일어난 것으로 추정되며, Larm 등의<sup>17)</sup> 결과보다 세포자멸사 형태의 세포 손상이 적은 이유는 AMPA의 농도와 자극 시간이 다르기 때문이었던 것으로 여겨진다.

뇌보호를 위해 MK-801과 같은 NMDA 수용체 길항제 들이 많이 연구되어 왔었는데,<sup>34)</sup> 최근에는 NMDA 수용체 길항제의 여러가지 부작용으로 인해 AMPA수용체 길항제들에 대한 연구들도 이루어지고 있다.<sup>35)</sup>

본 연구에서 사용한 propofol은 흔히 쓰이는 정맥마취제이며, 뇌보호 효과에 대해서는 in vivo와 in vitro에서 긍정적 혹은 부정적 의견들이 있다.<sup>8-14,36-38)</sup>

Propofol의 뇌보호 기전에 대해서는 여러가지 기전들이 제시되었는데, 두개내압의 감소, 뇌대사율의 감소, 뇌의 산소요구량 감소,<sup>8)</sup> 항산화제로 작용하여 유리기 제거자(free radical scavenger)로 작용하는 기전,<sup>9)</sup> glutamate 수용체에 길항제로서의 작용,<sup>10-12)</sup>  $\text{Na}^+$  이온채널 의존적 glutamate 분비 감소,<sup>13)</sup> 세포외 glutamate 농도의 감소 등이<sup>14)</sup> 보고되고 있으며, AMPA와 관련된 보고들은 많지 않다.

Yamakura 등은<sup>12)</sup> recombinant glutamate 수용체 channel을 이용한 연구에서, AMPA 수용체의 subtype에 따라 propofol에 대한 반응이 억제되기도 하고 증가되기도 함을 보고하였는데, 억제효과는 500  $\mu\text{M}$ 의 고농도 propofol에서만 일어난다 하였으며, 이는 50  $\mu\text{M}$  [임상 사용 가능 농도:  $\sim 35 \mu\text{M}$ ]<sup>12)</sup>의 propofol 투여가 세포사율을 49.3%에서 29.4%로 감소시킨 본 연구 결과와는 일치하지 않았다.

Krampfl 등은<sup>19)</sup> recombinant AMPA-type glutamate 수용체 channel을 이용하여 patch clamp실험을 한 결과 100  $\mu\text{M}$  이상의 propofol은 AMPA수용체의 탈감작에 관여하여 AMPA 자극을 오히려 강화한다 하였으며, Zhu 등은<sup>18)</sup> 112  $\mu\text{M}$ 의 propofol이 AMPA로 유도된 뇌독성의 증감에 아무 영향도 미치지 않는다 하였는데 이들 결과들도 본 연구와 일치하지 않았다.

Young 등은<sup>36)</sup> 백서를 이용한 in vivo 뇌허혈-재관류 실험에서 propofol을 뇌허혈 중간부터 재관류시까지 투여하였을 때 뇌경색 용적을 21% 감소시킬 수 있었다고 보고하였는데, 세포사율을 propofol 50  $\mu\text{M}$  첨가시 49.3%에서 29.4%로 낮춘 본 연구의 뇌보호 효과와 비슷하였으나, in vivo와 in vitro 실험 간의 차이가 있으므로 단순 비교는 어렵다.

Engelhard 등은<sup>37)</sup> 백서의 허혈-재관류 모델에서 propofol이 허혈 4시간 후에 괴사 뿐 아니라 세포자멸사를 유도하는

단백질인 Bax의 농도를 감소시킨다 보고하였으며, Chen 등은<sup>38)</sup> 백서 국소 허혈-재관류 모델은 괴사와 세포자멸사가 혼재된 뇌손상을 가져오며, propofol은 뇌경색면적을 감소시키는 등 뇌보호 효과가 있으며, 세포자멸사 감소에도 효과가 있었다 보고하였다.

뇌허혈-재관류시 glutamate가 상승하며, 이중 일부는 AMPA 수용체를 자극하여 괴사 혹은 세포자멸사 형태의 뇌 세포 손상이 온다 가정할 경우,<sup>15-17)</sup> propofol 50  $\mu\text{M}$  첨가시 AMPA 자극에 의한 뇌보호 효과를 보였으며, 세포자멸사 비율도 28%에서 20.1%로 낮춘 본 연구의 결과와 비슷하였다. 그러나, 본 연구에서 보인 세포자멸사의 억제가 AMPA 수용체 간의 직접적인 상호작용에 의한 것인지, Engelhard나 Chen 등의<sup>37,38)</sup> 연구에서와 같이 propofol이 AMPA 자극에 의해 유도된 세포자멸사 과정 중 일부에 관여해서 인지는 확실치 않으며, 추가 연구가 필요하다.

Propofol 50  $\mu\text{M}$ 은 백서 피질 신경원 배양 모델에서 72시간 동안 AMPA 50  $\mu\text{M}$  처치에 의하여 유도되는 신경세포사를 줄이고 세포사율 감소 원인 중 일부는 propofol에 의한 세포자멸사 감소에 기인한다 생각되어지며, 뇌보호 효과의 기전 등에 관한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-74.
2. Nishizawa Y: Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 2001; 69: 369-81.
3. Choi DW: Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-76.
4. Rothman SM, Olney JW: Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986; 19: 105-11.
5. Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW: N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 784-91.
6. Choi DW, Rothman SM: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
7. Koh JY, Goldberg MP, Hartley DM, Choi DW: Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J Neurosci* 1990; 10: 693-705.
8. Kochs E, Hoffmann WE, Werner C, Thomas C, Albrecht RF, Schult am Esch J: The effects of propofol on brain electrical activity: neurological outcome and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology* 1992; 76: 245-52.
9. Peters CE, Korcok J, Gelb AW, Wilson JX: Anesthetic concentrations of propofol protect against oxidative stress in primary astrocyte cultures. *Anesthesiology* 2001; 94: 313-21.

10. Hans P, Bonhomme V, Collette J, Albert A, Moonen G: Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. *J Neurosurg Anesthesiol* 1994; 6: 249-53.
11. Orser BA, Bertlik M, Wang LY, MacDonald JF: Inhibition by propofol (2,6 di-isopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 1761-8.
12. Yamakura T, Sakimura K, Shimoji K, Mishina M: Effects of propofol on various AMPA-, kainate- and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 1995; 188: 187-90.
13. Ligamaneni R, Birch ML, Hemmings Jr HC: Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol. *Anesthesiology* 2001; 95: 1460-6.
14. Velly LJ, Guillet BA, Masmejean FM, Nieoullon AL, Bauder NJ, Gouin FM, et al: Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate and its transporters. *Anesthesiology* 2003; 99: 368-75.
15. Garthwaite G, Garthwaite J: AMPA neurotoxicity in rat cerebellar and hippocampal slices: histological evidence for three mechanisms. *Eur J Neurosci* 1991; 3: 715-28.
16. Gaerthwaite G, Garthwaite J: Mechanisms of AMPA neurotoxicity in rat brain slices. *eur j neurosci* 1991; 3: 729-36.
17. Larm JA, Cheung NS, Beart PM: Apoptosis induced via AMPA-selective glutamate receptors in cultured murine cortical neurons. *J Neurochem* 1997; 69: 617-22.
18. Zhu H, Cottrell JE, Kass IS: The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate excitotoxicity. *Anesthesiology* 1997; 87: 944-51.
19. Krampfl K, Cordes AL, Schlesinger F, Wolfes H, Bufler J: Effects of propofol on recombinant AMPA receptor channels. *Eur J Pharmacol* 2005; 511: 1-7.
20. Watkins JC, Olverman HJ: Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 1987; 10: 265-72.
21. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Travnclis SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61.
22. Rothman SM, Thurston JH, Hauhart RE: The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 1985; 5: 1483-9.
23. Choi DW: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7: 369-79.
24. Gwag BJ, Koh JY, Demaro JA, Ying HS, Jacquin M, Choi DW: Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 1997; 77: 393-401.
25. Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15: 961-73.
26. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7162-6.
27. Madden DR: The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 91-101.
28. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S: Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 1991; 252: 851-3.
29. Seeburg PH: The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties. *J Neurochem* 1996; 66: 1-5.
30. Iino M, Ozawa S, Tsuzuki K: Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 1990; 424: 151-65.
31. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H: Differences in Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 1994; 12: 1281-9.
32. Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, et al: Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 1992; 256: 1566-70.
33. Frandsen A, Dreier J, Schousboe A: Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via N-methyl-D-aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors. *J Neurochem* 1989; 53: 297-99.
34. Choi DW: Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1990; 2: 105-47.
35. Montero M, Nielsen M, Rønn LC, Møller A, Noraberg J, Zimmer J: Neuroprotective effects of the AMPA antagonist PNQX in oxygen-glucose deprivation in mouse hippocampal slice cultures and global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 2007; 1177: 124-35.
36. Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG: Propofol neuroprotection in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Eur J Anesthesiol* 1997; 14: 320-6.
37. Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, Page M, Blobner M, Hutzler P, et al: Sevoflurane and propofol influence the expression of apoptosis-regulating proteins after cerebral ischaemia and reperfusion in rats. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21: 530-7.
38. Chen L, Xue Z, Jiang H: Effect of propofol on pathologic time-course and apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 413-9.
39. Gepts E, Claeys AM, Camu F: Pharmacokinetics of propofol ('Diprivan') administered by continuous intravenous infusion in man. A preliminary report. *Postgrad Med J* 1985; 61: 51-2.